

靶向HER2基因shRNA对小鼠Lewis细胞化疗敏感度的影响



曹新梅¹, 张岱权², 夏纪毅³, 王 栩¹, 高 燕¹, 熊 伟⁴

Effects of HER2 shRNA on Chemotherapy Sensitivity of Mouse Lewis Cells

CAO Xinmei¹, ZHANG Daiquan², XIA Jiyi³, WANG Xu¹, GAO Yan¹, XIONG Wei⁴

1.Department of Immunology, Luzhou Medical College,Luzhou 646000,China; 2.Department of Chinese Traditional Medicine,The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College;3.Reseach Center of Drug and Functional Food,Luzhou Medical College.4.School of Public Health

Abstract: Objective To investigate the effects of HER2 shRNA on the chemotherapy sensitivity of Mice Lewis cells.**Methods** pGPU6/RFP/Neo-erbB-2 and pGPU6/RFP/Neo-shNC plasmids were synthesized and transfected into mice Lewis cells by Lipofectamine 2000.The levels of HER2 mRNA and protein were tested by RT-PCR and Western blot, respectively.The apoptotic rates of cells in non-transfected group, pGPU6/RFP/Neo-shNC group,pGPU6/RFP/Neo-erbB-2 group,Carboplatin group, pGPU6/RFP/Neo-shNC plus Carboplatin group and pGPU6/RFP/Neo-erbB-2 plus Carboplatin group were tested by FCM.**Results** The levels of HER2 mRNA and protein in pGPU6/RFP/Neo-erbB-2 group were lower than those in pGPU6/RFP/Neo-shNC group and non-transfected group.The apoptotic rate of cells in pGPU6/RFP/Neo-erbB-2 plus carboplatin group was higher than those in other groups (all $P<0.01$).**Conclusion** HER2 shRNA could increase the sensitivity of mouse Lewis cells to carboplatin.

Key words:HER2;shRNA;Lewis cells;Chemotherapy sensitivity

摘 要: 目的 探讨靶向HER2基因shRNA对小鼠肺腺癌Lewis细胞化疗敏感度的影响。**方法** 应用Lipofectamine 2000将pGPU6/RFP/Neo-erbB-2、pGPU6/RFP/Neo-shNC质粒表达载体快速转染小鼠肺腺癌Lewis细胞;应用RT-PCR、Western blot检测各组HER2 mRNA、蛋白的表达。应用流式细胞术检测未转染对照组、pGPU6/RFP/Neo-shNC组、pGPU6/RFP/Neo-erbB-2组、卡铂组、pGPU6/RFP/Neo-shNC+卡铂组、pGPU6/RFP/Neo-erbB-2+卡铂组的细胞凋亡率。**结果** pGPU6/RFP/Neo-erbB-2组HER2 mRNA和蛋白的水平均低于pGPU6/RFP/Neo-shNC组和未转染对照组。pGPU6/RFP/Neo-erbB-2+卡铂组细胞的凋亡率高于其余各组(P 均 <0.01)。**结论** HER2 shRNA能增强小鼠Lewis细胞对卡铂的敏感度。

关键词: HER2; shRNA; Lewis细胞; 化疗敏感度

中图分类号: R734.2 文献标识码: A

0 引言

人表皮生长因子受体-2(HER2)基因, 编码P185, 是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、酪氨酸激酶受体家族的一员, 与EGFR家族其他成员形成异二聚体, 产生强烈的致瘤作用。临床研究表明, 非小细胞肺癌患者存在HER2基因的过表达^[1], 与其化疗耐药有关^[2]。本研究通过构建能够稳定表达HER2短发卡RNA(short hairpin RNA, shRNA)的质粒载体, 转染小鼠肺腺癌Lewis细胞株, 探讨HER2 shRNA表达

载体抑制HER2表达能否增强癌细胞对卡铂化疗的敏感度。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠肺腺癌Lewis细胞株(由泸州医学院免疫学实验室提供)。高糖DMEM培养液(美国Invitrogen公司)、胎牛血清(Hyclon公司)。pGPU6/RFP/Neo-erbB-2、pGPU6/RFP/Neo-shNC(上海吉玛公司构建), Lipofectamine 2000 Reagent、Trizol(美国Invitrogen公司)。焦炭酸二乙酯(DEPC)(美国Sigma公司)、RT-PCR试剂盒(日本Toyobo公司)。HER2鼠单克隆抗体(Abcam公司)、羊抗鼠二抗(碧云天)。卡铂(齐鲁制药有限公司), Annexin V-FITC Kit凋亡试剂盒(凯基公司)。

收稿日期: 2013-03-19; 修回日期: 2013-07-03
基金项目: 四川省卫生厅基金资助项目(100236)
作者单位: 1.646000 四川泸州, 泸州医学院免疫学教研室; 2.泸州医学院附属医院中医科; 3.泸州医学院药物与功能性食品研究中心, 4.公共卫生系
作者简介: 曹新梅(1979-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤免疫的研究

1.2 小鼠肺腺癌Lewis细胞株的培养

Lewis细胞株常规培养于含10%胎牛血清和青、链霉素的高糖DMEM培养液中，于37℃、5% CO₂培养传代。

1.3 转染

将对数生长期Lewis细胞株以2×10⁵个/孔接种于六孔板，细胞长满70%时进行转染。实验分组：pGPU6/RFP/Neo-erbB-2组、pGPU6/RFP/Neo-shNC组、未转染对照组。以Lipofectamine 2000为转染试剂，按照说明书进行转染。

1.4 RT-PCR检测HER2 mRNA的水平

转染48 h后，用Trizol试剂抽提每组细胞的总RNA，反转录，按照试剂盒说明以GAPDH为内参PCR扩增HER2。HER2上游引物：5'-GCCATCACC AGTGACAATAT-3'，下游引物：5'-TGATCTCCTC CAGGGTTTC-3'，产物长157 bp；GAPDH上游引物：5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3'，下游引物：5'-CTCGCTCCTGGAGAGTGGTG-3'，产物长233 bp。反应条件：94℃，2 min；(94℃ 30 s；55℃ 30 s；72℃ 1 min)，32个循环；72℃ 5 min。

1.5 Western blot检测HER2蛋白的表达

转染72 h后，用PBS洗细胞三次，用细胞裂解液裂解细胞提取总蛋白，上样进行SDS-PAGE电泳，转膜，封闭，依次加入HER2单抗、羊抗鼠二抗，显色，拍照。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

实验分组：未转染组、pGPU6/RFP/Neo-shNC组、pGPU6/RFP/Neo-erbB-2组、卡铂（60 μg/ml）组、pGPU6/RFP/Neo-shNC+卡铂组、pGPU6/RFP/Neo-erbB-2+卡铂组。消化细胞，制成单细胞悬液，洗涤两次。加入binding buffer每管500 μl，重悬细胞。加入Annexin V-FITC每管5 μl混匀后，加入PI每管5 μl，混匀，室温、避光，反应5 min，上流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.7 统计学方法

采用SPSS16.0统计软件分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多样本均数两两比较采用 q 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR检测HER2 mRNA的水平

pGPU6/RFP/Neo-erbB-2组的HER2 mRNA水平显著低于pGPU6/RFP/Neo-shNC组和未转染组，见图1。

2.2 Western blot检测HER2蛋白表达

pGPU6/RFP/Neo-erbB-2组的HER2 蛋白表达显著低于pGPU6/RFP/Neo-shNC组和未转染组，见图2。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

pGPU6/RFP/Neo-erbB-2+卡铂组的凋亡率高于未转染组、pGPU6/RFP/Neo-shNC组、pGPU6/RFP/Neo-erbB-2组、卡铂组、pGPU6/RFP/

Neo-shNC+卡铂组，差异有统计学意义（ $P < 0.01$ ），见图3、表1。

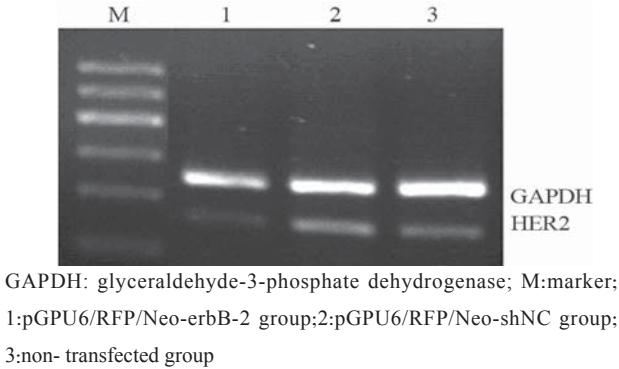


图1 RT-PCR检测HER2 mRNA水平
Figure1 HER2 mRNA level tested by RT-PCR

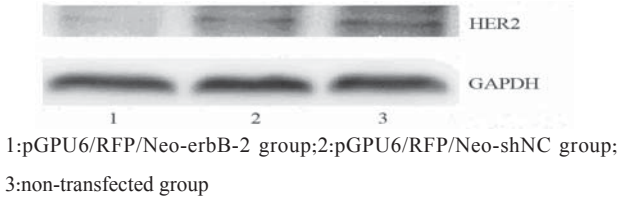


图2 Western blot检测HER2蛋白表达
Figure2 HER2 protein level tested by Western blot

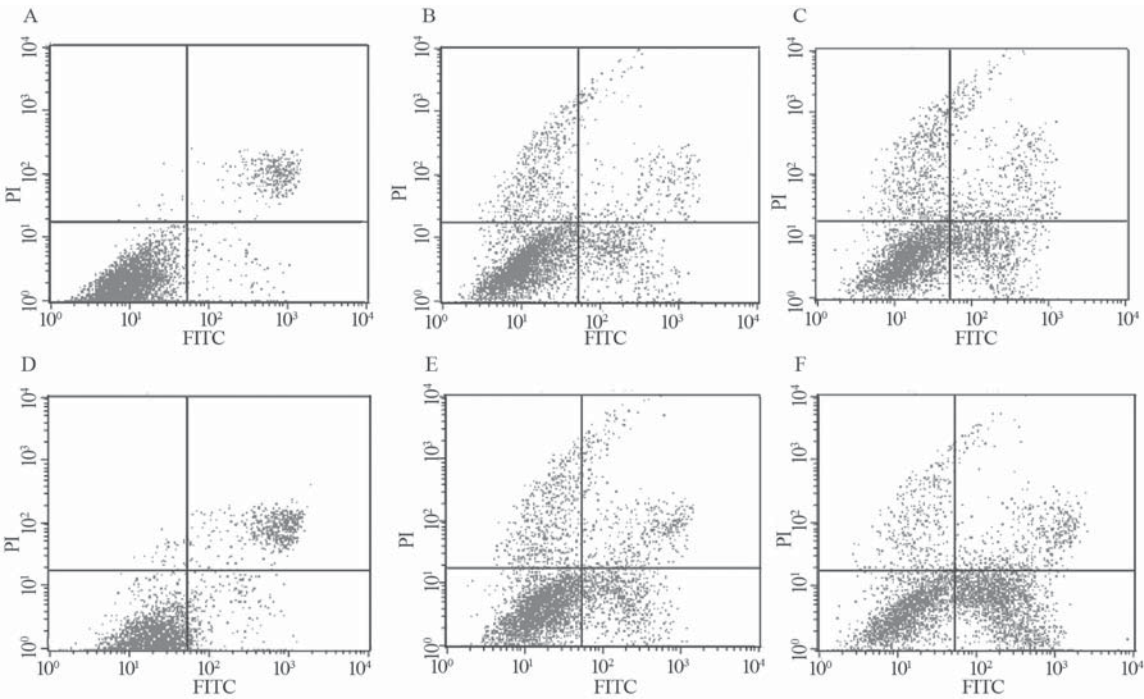
表1 Lewis细胞的凋亡率

Groups	Apoptotic rates (%)
Non-transfected group	3.53±0.45 [☆]
pGPU6/RFP/Neo-shNC	10.87±0.85 ^{☆☆}
pGPU6/RFP/Neo-erbB-2	17.84±1.98 ^{☆☆▲▲}
Carboplatin group	7.02±0.76 [☆]
pGPU6/RFP/Neo-shNC plus carboplatin group	15.38±0.36 ^{☆☆▲}
pGPU6/RFP/Neo-erbB-2 plus carboplatin group	33.21±9.65 ^{☆☆}

Notes: ^{*}: $P < 0.05$, ^{**}: $P < 0.01$, compared with non-transfected group; [☆]: $P < 0.01$, compared with pGPU6/RFP/Neo-erbB-2 plus carboplatin group; [▲]: $P < 0.05$, ^{▲▲}: $P < 0.01$, compared with carboplatin group

3 讨论

肺癌是常见的恶性肿瘤之一，其中非小细胞肺癌约占所有肺癌病例的84%^[1]。以铂类药物为主的化疗在肺癌的治疗中一直具有重要的意义，但容易形成耐药性。非小细胞肺癌患者存在HER2蛋白过度表达，且腺癌的阳性率最高^[2]。过表达HER2蛋白的非小细胞肺癌患者及人的非小细胞肺癌株对长春瑞滨、顺铂、阿霉素等化疗药物存在耐药性^[3-4]。HER2基因位于人染色体17q21，编码P185，是一种具有酪氨酸激酶活性的膜表面受体。HER2通过以下信号转导途径来调节细胞生存和增殖：ras/raf/线粒体活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）途径、磷脂酰肌醇-3



A:non-transfected group; B:pGPU6/RFP/Neo-shNC group; C:pGPU6/RFP/Neo-erbB-2 group; D:carboplatin group; E:pGPU6/RFP/Neo-shNC plus carboplatin group; F:pGPU6/RFP/Neo-erbB-2 plus carboplatin group

图3 流式细胞术检测Lewis细胞的凋亡率

Figure3 Apoptotic rates of Lewis cells tested by FCM

激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶向基因（mammalian target of rapamycin, mTOR）途径^[5]。HER2过表达或结构的异常变化常可导致细胞生长异常及癌肿的形成。

RNA干扰是应用特异的siRNA有效抑制内源性基因的表达。由于RNA干扰具有高效、特异、快速、不良反应小等优点，且能在转录后显著抑制基因的表达，是研究基因功能的重要工具，并逐步成为对肿瘤、病毒性疾病等进行基因治疗研究的一种手段^[6-7]。有研究^[8-9]显示，HER2 siRNA能增强人肺腺癌细胞株对铂类化疗药物的敏感度。本实验中，pGPU6/RFP/Neo-erbB-2表达载体能抑制小鼠肺腺癌Lewis细胞株HER2基因的表达，并且能增强该细胞对卡铂的敏感度，为后期构建低表达HER2基因的小鼠肺腺癌模型并进行小鼠模型化疗增敏方面的实验奠定了基础。

参考文献:

[1] Dettterbeck FC,Boffa DJ,Tanoue LT,*et al*.The new lung cancer staging system[J].Chest,2009,136(1):260-71.

[2] Liu HY,Wang XM,Shan J,*et al*.The expression of E-cadherin and C-erbB2 in NSCLC and theirs significances[J].Zhongguo Wu Zhen Xue Za Zhi, 2008,8(13):3025-8.[刘汉勇,王晓玫,单军,等. E-cadherin和C-erbB2在非小细胞肺癌中的表达及其临床病理意义[J]. 中国误诊学杂志,2008,8(13):3025-8.]

[3] Yang CX,Bian BX,Song ZY.The clinical observation about over

expressions of C-erbB-2 on prognosis of lung adenocarcinoma[J]. Zhong Liu Ji Chu Yu Lin Chuang,2007,20(6):482-3.[杨成喜,卞宝祥,宋子焱.C-erbB-2过度表达对肺腺癌化疗疗效影响的临床观察[J].肿瘤基础与临床,2007,20(6):482-3.]

[4] Tsai CM,Chang KT,Wu LH,*et al*.Correlations between intrinsic chemoresistance and HER-2/neu gene expression, p53 gene mutations, and cell proliferation characteristics in non-small cell lung cancer cell lines[J].Cancer Res,1996,56(1):206-9.

[5] English DP,Roque DM,Santin AD.HER2 expression beyond breast cancer: therapeutic implications for gynecologic malignancies[J]. Mol Diagn Ther,2013,17(2):85-99.

[6] Sharp PA.RNA interference-2001[J].Genes Dev,2001,15(5): 485-90.

[7] Bemstein E,Caudy AA,Hammond SM,*et al*.Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RAN interference[J].Nature, 2001,409(6818):363-6.

[8] Ren SH,Zhang L,Wang JW,*et al*.The effect of siRNA-Her2/ neu on the drug sensitivity of Her2/neu-overexpressing lung adenocarcinoma cell line[J].Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2006,29(1):35-8.[任淑华,张林,王井伟,等.靶向Her2 / neu基因小干扰RNA对肺腺癌Calu-3细胞株药物敏感性的影响[J].中华结核和呼吸杂志,2006,29(1):35-8.]

[9] Cao XM,Zhang DQ,Wang X,*et al*.Inhibition of A549 cells by siRNA targeting for HER2 gene combining with carboplatin[J]. Shandong Yi Yao,2012,52(29):43-4.[曹新梅,张岱权,王栩,等.靶向HER2的siRNA联合卡铂对肺腺癌细胞A549的抑制[J].山东医药,2012,52(29):43-4.]